

AO 1347

ARTICLE PRINCIPAL

Recouvrant en partie

LA THESE DE DOCTORAT ES SCIENCES NATURELLES

présentée

A LA FACULTE DES SCIENCES DE

DE PARIS

par

Jean PELMONT

pour obtenir

le grade de Docteur Es-Sciences

Sujet de la Thèse: Propriétés de l'induction in vitro
de la β -galactosidase dans une fraction membranaire
dérivée des sphéroplastes de Escherichia coli.

soutenue le

12 AVRIL 1967

devant la Commission
d'Examen

MM. DUBERT Président
SCHAEFFER Examineurs
GROS

COLLOQUES INTERNATIONAUX
DU
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

N° 124

MÉCANISMES DE RÉGULATION DES ACTIVITÉS CELLULAIRES CHEZ LES MICROORGANISMES

Marseille
23-27 Juillet 1963

EXTRAIT

ÉDITIONS DU CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
15, quai Anatole-France - PARIS-VII

1965

LA SYNTHÈSE INDUITE DES PROTEINES SPÉCIFIQUES ET DES ARN-MESSAGERS PAR UNE FRACTION SUBCELLULAIRE D'*ESCHERICHIA COLI* *

MM. Bention NISMAN, Jean PELMONT, David BISHOP,
Josette DEMAILLY et Alexandre YAPO

Laboratoire d'Enzymologie Microbienne du C.N.R.S., Gif-sur-Yvette (Seine-et-Oise)

SUMMARY

INDUCED SYNTHESIS OF SPECIFIC PROTEINS AND MESSENGER — RNA BY A SUBCELLULAR FRACTION FROM
Escherichia coli

We have studied the specific protein and RNA synthesis by a subcellular bacterial fraction (P_1). This fraction is prepared by digitonine lysis of penicillin-produced spheroplasts of *Escherichia coli*. The synthesis of two specific proteins, β -galactosidase and alkaline phosphatase, have been studied in order to determine the universal steps involved in protein synthesis.

We have shown that the induction of either enzyme by P_1 fractions prepared from their respective non-constitutive bacterial strains, requires the presence in the incubation mixture of amino acids, $MgCl_2$, $MnCl_2$, the four ribose nucleoside triphosphates, RNA and DNA isolated from the constitutive strain, a source of energy and an inducer or « inducing » conditions. For the induction of β -galactosidase, isopropylthiogalactoside (IPTG) acts as an efficient inducer in the *in vitro* conditions. However melibiose and lactose, which are effective in inducing the enzyme in spheroplasts or bacterial cells, are not effective for *in vitro* induction of the enzyme. For alkaline phosphatase induction the actual nature of inducer is unknown, the enzyme is however induced when orthophosphate is limiting in the incubation mixture. The presence of small amounts of orthophosphate ($1-2 \mu\text{mole}$) inhibits induction. Our studies on the inductions of both β -galactosidase and alkaline phosphatase have shown that for the enzyme to be synthesized there must be an obligatory preceding synthesis of RNA. This RNA termed « messenger » or « informational » RNA is apparently the material functionally operative for the transmission of genetic information (contained in the DNA) to the protein synthesizing sites, through the RNA polymerase.

We have demonstrated that this RNA has a small molecular weight and sediments on a sucrose gradient with the $4-10 S$ RNA. The formation of this RNA can be inhibited by addition to the incubation mixture of actinomycin D. When actinomycin is added to the *in vitro* incubation mixture, not only is RNA synthesis inhibited by 80 % but the protein induction is completely stopped.

We have furthermore demonstrated that actinomycin D inhibition of protein induction can be partially overcome by addition to the incubation mixture of either the messenger RNA extracted from the constitutive bacterial strain, or a messenger RNA synthesized *in vitro*.

These facts have shown, for the induction of both alkaline phosphatase and β -galactosidase, that RNA is an obligatory intermediate in the transfer of genetic information.

The kinetics of β -galactosidase induction show an increase of the enzyme in function of time after an initial lag-phase of 30 minutes, whereas the synthesis of alkaline phosphatase appears to be linear with time after the initial lag.

With β -galactosidase induction we have found that incubation after the cessation of amino acid incorporation (produced by addition of chloramphenicol) resulted in a two fold increase in total enzyme. This we have termed a « post-incubation effect ». It is now apparent that the increase in enzyme may result from the association of monomers in forming the enzymatically active polymer. The presence of enzymatically inactive

* Ce travail a été subventionné par le National Institute of Health (NIH-gM-08764-02), l'USAF (EOAR 62-50), la Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique (FR. 61-117) et le Department de Biologie du Commissariat à l'Energie Atomique.

monomers formed during incubation has been demonstrated from antibody studies. With alkaline phosphatase there is only a slight increase in total enzyme during a similar period of post incubation. It is known that alkaline phosphatase has a molecular weight of about 80.000 and consists of two similar monomers; β -galactosidase however has a molecular weight of around 500.000 and consists of four monomers.

Attempts at dissociating the protein synthesizing sites from the P_1 fraction have shown that the basic synthesizing site of protein is a small particulate material closely associated with the bacterial membrane.

The dissociation of the particulate fraction P_1 has been successfully achieved by short sonication (2 min. 30 in a 10 Kc Raytheon) or by repeated syringing. Under both conditions the P_1 fraction is dissociated in an inactive supernatant and a membrane fraction sedimentable after 10-15 min. at 15 000 x g.

The recombination of both fractions results in a several fold stimulation of the induced enzyme synthesis as well as amino acids incorporation. The results are similar with both enzyme systems.

La lyse des protoplastes d'*Escherichia coli* par la digitonine, permet d'obtenir une fraction particulée subcellulaire facilement sédimentable, contenant des fragments de membrane cytoplasmique et les structures associées, et renfermant tout le DNA de la cellule. Cette fraction n'incorpore pas seulement les acides aminés marqués dans les protéines, mais peut réaliser la synthèse complète d'enzymes spécifiques : la β -galactosidase et la phosphatase alcaline. Lorsque la souche bactérienne utilisée est constitutive pour l'une de ces enzymes, la formation de celle-ci n'exige pas l'addition au mélange réactionnel d'un inducteur. Par contre si la souche est inducible, la synthèse *in vitro* ne peut se faire qu'en présence de l'inducteur. Cette fraction découverte en 1959 (NISMAN et FUKUHARA, 1959) et appelée P_1 , constitue le premier système ayant montré la formation induite *in vitro* de protéines biologiquement actives et rendant accessible l'étude de certains phénomènes essentiels de la régulation cellulaire.

Nous nous proposons ici de rassembler les principales données ayant trait à la biosynthèse des protéines et de l'acide ribonucléique par la fraction P_1 . Notre attention se portera notamment sur : 1) les modalités de l'induction *in vitro* de la β -galactosidase et de la phosphatase alcaline; 2) l'existence d'une phase d'activation ou de polymérisation transformant un précurseur inactif en protéine enzymatique active; 3) les différents facteurs réglant l'induction au sein de la fraction P_1 ; 4) la mise en évidence d'un site actif au niveau de la membrane.

Les observations réalisées jusqu'à maintenant permettent de se représenter cette synthèse induite *in vitro* comme un processus placé sous la dépendance d'un système de transcription génétique $\text{DNA} \rightarrow \text{RNA} \rightarrow \text{protéines}$, localisés dans des particules liées intimement à la membrane. L'induction réglée par un processus de répression au niveau des structures actives, ne ferait pas nécessairement appel à la synthèse intermédiaire d'un répresseur libre. La synthèse de l'enzyme actif n'est exprimable qu'en fonction d'une réaction d'activation terminale de la molécule, encore contrôlée par le DNA, peut être basée sur l'association de sous-unités de faible masse moléculaire.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les souches bactériennes utilisées sont : 1) pour la synthèse de β -galactosidase *E. coli* K 12 200 PS (i^+z^+), 3300 (i^-z^+), Y 23 (délétion Z^- , 20 SO (z^-), E 102 (i^+z^+), E 103 (i^+z^+ partiellement constitutif à 44 °C), U 178 ($i^-z^+_M$) formant un monomère inactif de l'enzyme); 2) pour la synthèse de phosphatase alcaline : souche K 10 de *E. coli* K 12 type sauvage ($R_1+R_2+P^+$) et mutants C_2 ($R_1-R_2+P^+$) et C_4 ($R_1+R_2-P^+$).

La fraction P_1 est préparée par lyse à la digitonine des protoplastes selon la méthode décrite par NISMAN et coll. (1962 a et b) modifiée par adjonction de 0,2 g de bentonite par 100 ml de lysat. Pour l'étude de la synthèse de β -galactosidase la fraction P_1 après lavage est suspendue dans le milieu 10 (KCl 2 M, Tris 10^{-2} M pH 7,3, Mg^{++} $1,5 \cdot 10^{-2}$ M, pénicilline 2 000 U/ml). Pour l'étude de la phosphatase alcaline, la fraction P_1 est resuspendue dans le milieu 1 (Saccharose 0.5 M, Tris 10^{-2} M pH 7,3, Mg^{++} $1,5 \times 10^{-2}$ M, pénicilline 2 000 U/ml. En vue d'une standardisation le volume final est calculé de la façon suivante : la densité optique (Do) à 600 m μ de la suspension des protoplastes, repris dans

120 ml de milieu 1 avant la lyse, est mesurée à l'aide d'une dilution (1/50 dans le milieu 1). Le volume de la suspension finale en ml est donné par le produit : $8 \times \text{DO}$. La composition moyenne obtenue est en protéines : 1,35 mg/ml ; RNA : 0,20 mg/ml ; DNA : 0,17 mg/ml.

Les dosages de protéines et d'acides nucléiques sont effectués après précipitation des échantillons par le TCA 10 % froid et deux lavages par le TCA 10 %. Les protéines sont dosées par la méthode de LOWRY *et coll.* (1951), le RNA par celle de MEJBAUM (1963) et le DNA par la méthode de DISCHE modifiée par BURTON (1956).

La β -galactosidase est dosée par la méthode colorimétrique de MONOD (1952) dans un mélange de volume final 3,50 ml, contenant un aliquot de 0,3 ml du mélange d'incubation, ONPG μM , β -Mercapto-éthanol 100 μM , phosphate de Na ($\text{pH}^{7.2}$) 250 μM . La réaction est arrêtée avec 500 μM de carbonate de sodium.

La phosphatase alcaline est dosée selon GAREN et LEVINTHAL (1959), de la manière décrite par BISHOP et NISMAN (1963).

L'incorporation des acides aminés est évaluée par la méthode décrite par NISMAN *et coll.* (1962).

Les préparations de RNA et DNA utilisées ont été effectuées selon NISMAN *et coll.* (1962) et BISHOP *et NISMAN* (1963).

CINÉTIQUE DE L'INDUCTION DE LA β -GALACTOSIDASE

La synthèse de la β -galactosidase par la fraction P_1 de souche inductible (200 PS/F Lac.+) (i^+z^+) préparée selon NISMAN *et coll.*, 1962, n'est possible qu'en présence d'un inducteur. Sur la figure 1 cette

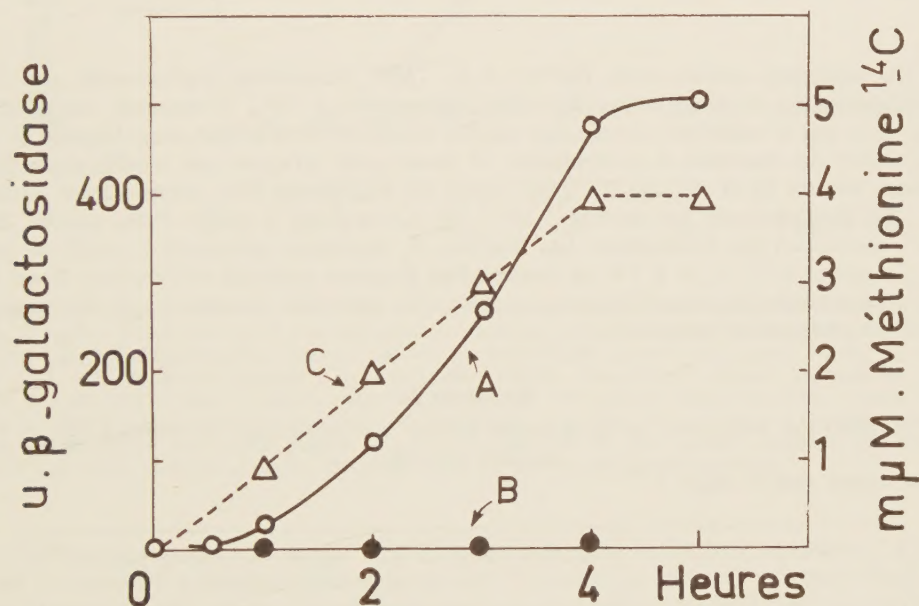


FIG. 1

Cinétiques en fonction du temps : A) de l'induction de la β -galactosidase; B) de l'induction de la β -galactosidase en présence d'actinomycine D (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$); C) de l'incorporation de méthionine- ^{14}C . Le mélange d'incubation comprend : Tris pH 7,4 : 100 $\mu\text{M}/\text{ml}$, IPTG 0,5 $\mu\text{M}/\text{ml}$, phosphoénolpyruvate (Na) 10 $\mu\text{M}/\text{ml}$, pyruvate-kinase (Sigma) 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, ATP, GTP, CTP et UTP 0,05 $\mu\text{M}/\text{ml}$ chacun, Mn^{++} 3 $\mu\text{M}/\text{ml}$, Mg^{++} 8 $\mu\text{M}/\text{ml}$, acides aminés 10,6 $\mu\text{M}/\text{ml}$ (mélange de tous les acides aminés en proportions représentant la composition de la β -galactosidase) dont 0,2 $\mu\text{M}/\text{ml}$ de 1-méthionine, 1-méthionine- ^{14}C (CEA) 0,06 $\mu\text{M}/\text{ml}$ (0,65 μC). Fraction P_1 en suspension dans le milieu 10 pour une concentration finale de protéines totales de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ environ, pénicilline $2-5 \times 10^3$ U/ml. Incubation à 37 °C. Les échantillons prélevés aux temps indiqués sont refroidis dans la glace et dosés aussitôt. Les résultats sont exprimés par mg de protéines totales.

synthèse, induite par l'isopropyl β -D-thiogalactoside (IPTG), possède la cinétique indiquée : la vitesse, faible au début, s'accélère rapidement dans le temps, pendant une période de 4 heures à 37 °C. L'incorporation de la méthionine C^{14} (CEA), suivie parallèlement, est linéaire. Un plateau est atteint simultanément par la synthèse de l'enzyme et l'incorporation de méthionine marquée (fig. 1, Tableau I).

TABLEAU 1

Induction de la β -galactosidase et de la phosphatase alcaline par la fraction P_1 .

La composition du mélange et les conditions d'incubation sont celles de la figure 1 et 2. La DNase et la RNase sont ajoutées au système 45 minutes avant incubation.

β -galactosidase (souche 200 PS (3 h à 37°))	unités par mg. de protéines	phosphatase alcaline (souche K10 type sauvage) 4 h 37°C	unités par mg. de protéines
1° Système complet	446	Système complet	4320
" + DNase (10 μ g/ml)	94	+ DNase (20 μ g/ml)	250
" + RNase (10 μ g/ml)	105	+ RNase (30 μ g/ml)	60
2° Système complet	425	- phosphoénol pyruvate et pyruvate kinase	3710
" - ATP, UTP, GTP	190	- ATP, UTP, GTP et CTP	1710
" - UTP	190	- UTP	1910
" - CTP	190	- $CaCl_2$	40
" glucose (10^{-3} M)	20	- glucose	1300
" acides aminés	0	- acides aminés	180

Parmi les inducteurs utilisés seuls l'IPTG et le TMG (thiométhyl β -galactoside) ont donné des résultats satisfaisants. Le lactose (tableau 2) induit faiblement. Le TPG (thiophényl β -D-galactoside) est sans activité, ainsi que le melibiose. Ce résultat semble confirmer l'hypothèse selon laquelle le melibiose, excellent inducteur des bactéries et protoplastes, ne serait actif qu'après une modification métabolique par une enzyme absente de la fraction P_1 . Dans toutes les expériences nous avons adopté comme inducteur l'IPTG. La dose optimale est environ $5 \cdot 10^{-4}$ M. La synthèse à partir d'une souche constitutive (3300) I-Z⁺ ne requiert pas d'inducteur. Les fractions P_1 également préparées à partir de souches z⁻ (délétion Y 23, mutant z-20 S₀ et X 74) ne donnent lieu à aucune synthèse de l'enzyme. Il est donc clair que P_1 recèle les potentialités caractéristiques de la souche, propriété essentielle que l'on retrouve aussi dans le cas de la phosphatase alcaline.

TABLEAU 2

*Effet des inducteurs sur la synthèse induite « in vitro » par la fraction P_1
(souche 200 PS)*

Conditions comme dans la figure 1.

		Unités formées par mg de protéines totales Temps d'incubation		
		60 min.	120 min.	180 min.
IPTG	$3 \cdot 10^{-4}$ M	99	280	326
	$6 \cdot 10^{-4}$ M	98	411	700
TMG	10^{-3} M	43	190	380
TPG	10^{-3} M	0	0	0
Lactose	10^{-3} M	0	7	14
Melibiose	10^{-3} M	0	0	0

INDUCTION *in vitro* DE LA PHOSPHATASE ALCALINE

Des faits similaires s'observent pour la synthèse induite *in vitro* de la phosphatase alcaline (fig. 2). La fraction P_1 de la souche K 10 ($R_1+R_2+P^+$) (GAREN et ECHOLS, 1962) cultivée en l'absence d'orthophosphate montre une augmentation d'activité enzymatique qui est en moyenne de 10 fois par rapport à l'activité de base après 4 heures d'incubation (fig. 2). Après une latence de 30 à 40 minutes la cinétique

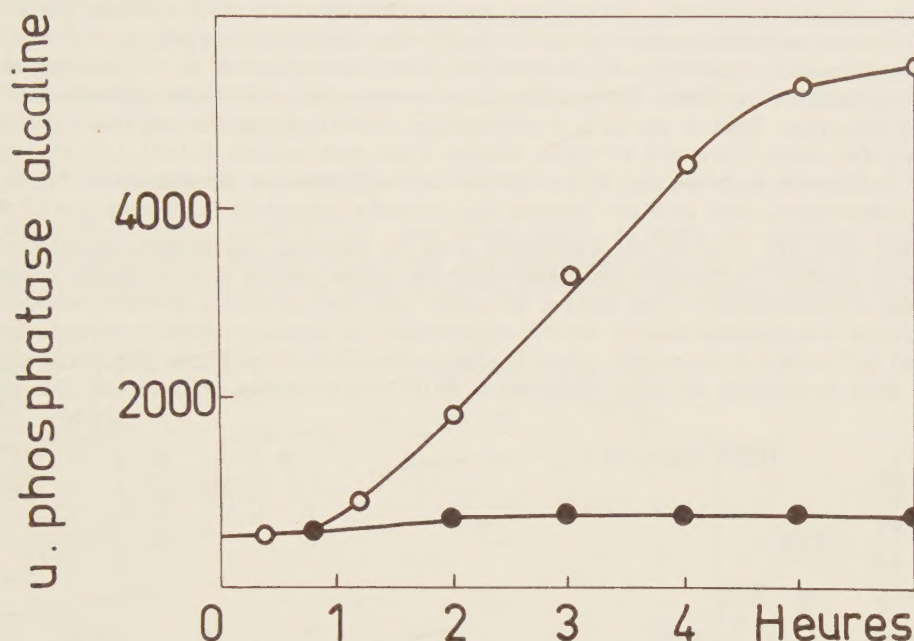


FIG. 2

Cinétique en fonction du temps de l'induction de la phosphatase alcaline sans actinomycine (cercles blancs) et en présence de 20 $\mu\text{g/ml}$ d'actinomycine D (cercles noirs). Le mélange d'incubation comprend : Tris pH 7,3 100 $\mu\text{M/ml}$, saccharose 300 $\mu\text{M/ml}$, phosphoénolpyruvate 1 $\mu\text{M/ml}$, pyruvate-kinase (Sigma) 0,05 $\mu\text{g/ml}$, NADP^+ 3 $\mu\text{M/ml}$, ATP, GTP, CTP, UTP 0,2 μM chacun, glucose 3 $\mu\text{M/ml}$, acides aminés 10,6 $\mu\text{M/ml}$ (mélange de tous les acides aminés selon BISHOP et coll., 1963), CaCl_2 6 $\mu\text{M/ml}$, Mg^{++} 8 $\mu\text{M/ml}$, KCl 100 $\mu\text{M/ml}$, acides nucléiques totaux de *E. coli* C4 (DNA 56 μg et RNA 100 μg), pénicilline 5×10^3 U/ml, fraction P_1 suspendue dans le milieu 1 correspondant à 10-100 μg de protéines; l'actinomycine est ajoutée dans le système correspondant 45 min. avant incubation; les échantillons sont refroidis à 0° aux temps indiqués et dosés. Résultats exprimés par mg de protéines totales.

se montre linéaire en fonction du temps et diffère ainsi de celle de la β -galactosidase. La synthèse est bloquée par la présence d'orthophosphate : le tableau 1 montre la nécessité presque absolue de CaCl_2 comme complexant du phosphate minéral ainsi que celle du glucose. Le rôle joué par le glucose dans l'induction de la phosphatase alcaline ne serait pas dû, comme nous le verrons par la suite, à son utilisation éventuelle comme métabolite, mais plutôt à une répression exercée sur d'autres systèmes enzymatiques.

MISE EN ÉVIDENCE D'UN PRÉCURSEUR ENZYMATIQUE INTERMÉDIAIRE
DANS LA SYNTHÈSE *in vitro* DE LA β -GALACTOSIDASE

Les deux enzymes étudiés ont des masses moléculaires très différentes : au lieu de 80 000 pour la phosphatase alcaline (GAREN et LEVINTHAL, 1960), celle de la β -galactosidase atteint 500 000 (selon PERRIN, 1963 ; ZABIN, 1963). Cette différence paraissait de nature à expliquer la discordance des cinétiques de formation *in vitro* constatées plus haut. Les faits suivants sont compatibles avec une telle interprétation.

Le chloramphénicol (CAL) ou la puromycine, ajoutés au temps zéro de la synthèse, empêchent toute induction *in vitro* de la β -galactosidase ou de la phosphatase alcaline et suppriment l'incorporation des acides aminés radio-actifs. L'addition de l'antibiotique à un instant donné de la réaction, arrête cette incorporation et inhibe la synthèse de l'enzyme, sans toutefois empêcher une augmentation ultérieure de l'activité enzymatique. Dans le cas de la β -galactosidase, cette augmentation est très importante : une post-incubation d'au moins 4 heures à 37° après addition d'une dose massive de CAL (1-2 mg/ml) entraîne une élévation de l'activité de 2 fois (fig. 3). La synthèse de la phosphatase alcaline donne lieu à l'observation du même phénomène, mais avec une intensité bien moindre puisqu'elle ne dépasse pas 15 % (fig. 3).

Ce résultat peut être expliqué par l'activation d'un ou plusieurs précurseurs inactifs de l'enzyme selon un type de réaction indépendant de l'assemblage des acides aminés dans la chaîne polypeptidique. Dans le cas de la β -galactosidase il est logique de penser que cette activation pourrait correspondre à la polymérisation des 4 monomères inactifs ou à la condensation de plusieurs chaînes polypeptidiques (sous-unités de base) qui forment le monomère. Dans la phosphatase alcaline, molécule plus petite et constituée seulement de deux monomères de masse moléculaire 40 000, ce processus s'effectuerait plus rapidement.

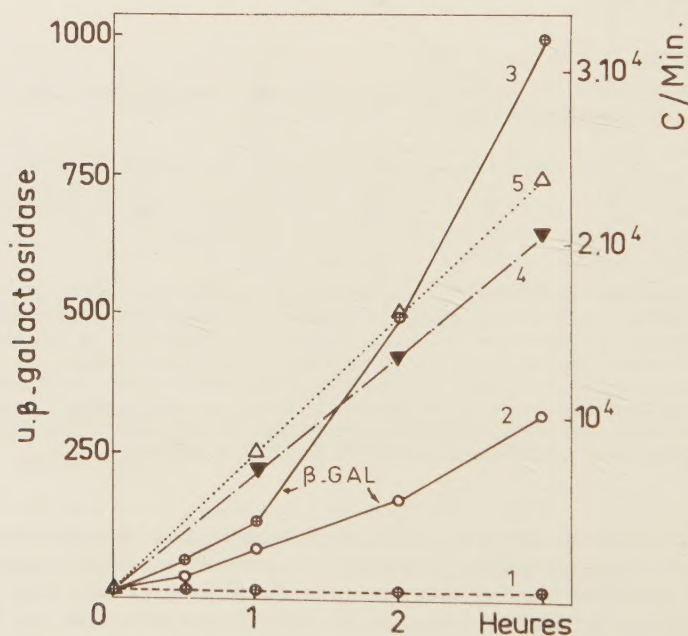


FIG. 3

1) Synthèse de β -galactosidase après addition de 1 mg/ml de CAL au temps zéro de la réaction; 2) Synthèse de β -galactosidase en l'absence de CAL : les aliquots prélevés aux temps indiqués sont dosés aussitôt (après addition de 1 mg/ml CAL); 3) comme (2), mais les aliquots prélevés aux temps indiqués reçoivent 1 mg/ml CAL et sont de nouveau incubés 4 heures à 37° avant dosage; 4) incorporation de méthionine-¹⁴C dans les mêmes conditions que (2); 5) incorporation de méthionine-¹⁴C dans les conditions de (3) : les aliquots sont de nouveau incubés 4 heures à 37° en présence de CAL avant d'être précipités par le TCA. Résultats exprimés par mg de protéines totales. Autres conditions comme dans la figure 1. Les mêmes résultats ont été obtenus par la puromycine (5×10^{-8} M).

L'analyse immunologique des constituants formés au cours de la réaction a été faite en collaboration avec P. FEIGELSON, 1963; ses résultats confirment l'existence d'intermédiaires protéiques ayant la spécificité antigénique de la β -galactosidase.

L'analyse immunologique a été effectuée au moyen d'un sérum anti/ β -galactosidase, par titration en zone d'équivalence du mélange réactionnel après différents temps d'incubation. Cet antisérum nous a été aimablement fourni par D. PERRIN et a été préparé au moyen de la β -galactosidase purifiée. Nous l'avons épuisé avant son emploi par un extrait de la souche à délétion Y 23. Ces expériences seront décrites prochainement plus en détail; elles mettent en évidence la formation précoce d'antigènes ayant la spécificité de la β -galactosidase, bien avant le grand accroissement de l'activité enzymatique.

A la lumière de ces données nous avons effectué toutes les expériences ultérieures en « post-incubant » 12 heures environ à 37 °C le mélange réactionnel après arrêt de l'incorporation des acides aminés par une très forte dose de chloramphénicol. Dans ces conditions se trouve révélé au maximum tout l'enzyme formé par le système (NISMAN et coll., 1963).

CARACTÈRES DE LA SYNTHÈSE INDUITE ET TAILLE DES ENZYMES FORMÉES

En collaboration avec J. BOEZI (1962) nous avons analysé le profil des protéines formées par la fraction P₁ en présence ou en absence d'inducteur. Par chromatographie sur colonne de cellulose DEAE et élution des protéines par un gradient linéaire de NaCl 0-0,8 M nous avons constaté une nette diffé-

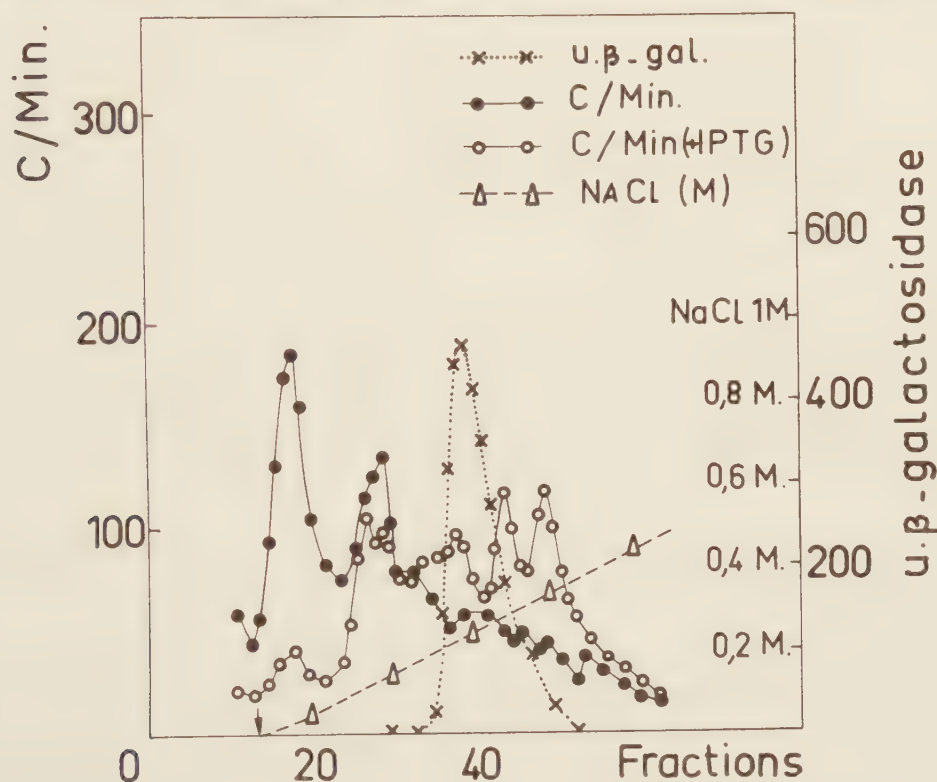


Fig. 4

Chromatographie sur cellulose-DEAE des protéines synthétisées par la fraction P₁, avec ou sans IPTG. Les conditions sont celles de la figure 1, le mélange (5 ml) contenant 10 μ M de méthionine-¹⁴C (43 μ C) et 40 μ M d'acide-DL-glutamique-¹⁴C (132 μ C). Après 4 heures à 37° le mélange est sonné 5 min. centrifugé 10 min. à 15 000 x g, dialysé 48 heures contre du Tris 10⁻² M, pH 7,3, Mg⁺⁺ 10⁻³ M, placé sur colonne DEAE 10 cm x 1 cm², élué par un gradient de NaCl 0-8 M; les fractions (2 ml) sont titrées pour la β -galactosidase ou l'incorporation des acides aminés marqués.

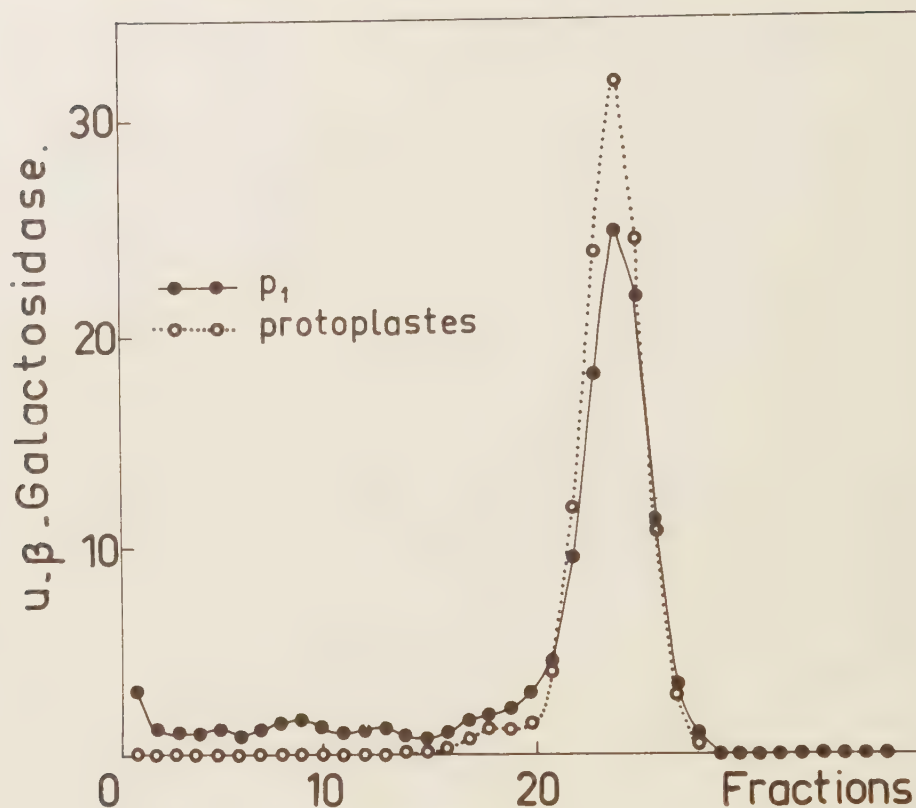


FIG. 5

Sédimentation en gradient de saccharose de la β -galactosidase synthétisée par les protoplastes induits de *E. coli* 200 PS ou par la fraction P₁ de la même souche. Le mélange d'incubation (10 ml) est réalisé pour la synthèse *in vitro* comme dans la figure 1 et incubé 4 heures à 37°; mélange et suspension de protoplastes sont sonnés et centrifugés comme dans la figure 4, dialysés contre Tris pH 7,3 10⁻² M, Mg⁺⁺ 10⁻³ M, β -mercaptoéthanol 10⁻⁴ M, concentrés à 1 ml et placés sur un gradient 5-20 % de 25 ml, centrifugés 14 heures à 25 000 t/m (rotor SW 25). On a collecté 7 gouttes par fraction. Dans le cas de l'enzyme fait *in vitro* on observe constamment de petites quantités de matériel actif à sédimentation rapide; une certaine partie de l'enzyme (10 à 15 %) n'est pas détachée des particules par sonnation: ces propriétés semblent être en rapport avec une association initiale intime de l'enzyme avec les particules.

rence entre les protéines formées dans les deux conditions d'incubation: la figure 4 montre l'apparition de plusieurs pics de protéines formées uniquement quand le mélange a été incubé en présence de l'inducteur. L'activité de la β -galactosidase se trouve dans la région des protéines induites.

Des expériences réalisées sur l'induction de la phosphatase alcaline en utilisant la même technique mettent en évidence un pic de protéines, marquées par l'incorporation de plusieurs acides aminés; ce pic correspond à la phosphatase alcaline (BISHOP et coll., 1963).

La comparaison par sédimentation en gradient de saccharose des tailles de la β -galactosidase synthétisée dans la fraction P₁ ou formée par les protoplastes de la souche induite montre que les deux enzymes ont la même masse moléculaire. Des expériences analogues sur la phosphatase alcaline conduisent aux mêmes conclusions (fig. 5, 6).

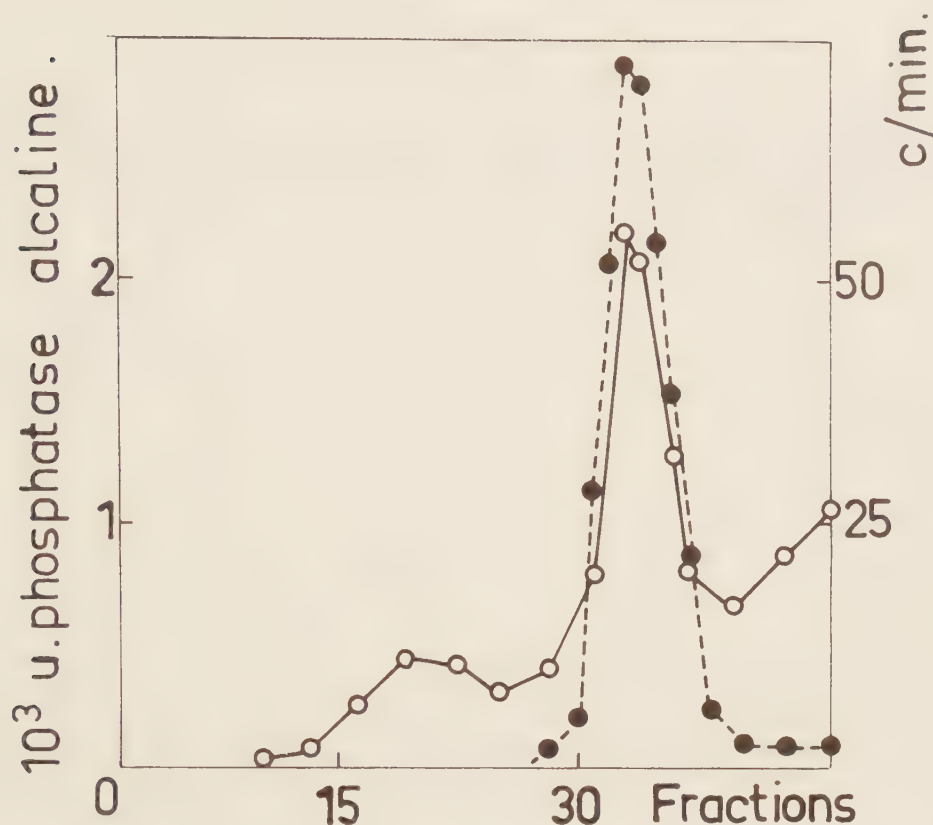


FIG. 6

Sédimentation en gradient de saccharose de la phosphatase alcaline radio-active faite par la fraction P_1 de *E. coli* K 10. L'enzyme a été obtenue par incubation pendant 4 heures à 37° d'un mélange de 20 ml contenant 10 μ M de 1-méthionine- 14 C (43 μ C) et 40 μ M d'acide DL-glutamique- 14 C (132 μ C) et lentement agité. Le mélange est sonné et centrifugé comme dans la figure 4; le surnageant obtenu (28 000 U d'enzyme) est concentré à 2 ml, chromatographié sur cellulose-DEAE, élué par un gradient de NaCl 0-0, 2M. Les fractions contenant l'enzyme sont ramenées à 1 ml et centrifugées dans un gradient de saccharose 5-20 % dans des conditions identiques à celles de la figure 5. Cercles blancs : radio-activité; cercles noirs : unités d'enzyme.

SYNTHÈSE DE RNA

La fraction P_1 incorpore les nucléoside-triphosphates marqués (CTP- α - 32 P, ATP et GTP-8- 14 C, UTP-2- 14 C) sous forme précipitable à l'acide trichloracétique, selon une cinétique approximativement linéaire pendant 30 à 45 minutes. Le produit formé, détruit par l'alcali et la RNase, est du RNA; l'IPTG stimule faiblement cette incorporation (PELMONT et coll., 1963).

Les caractères de cette synthèse, qui est maximale en présence des quatre nucléoside-triphosphates (tableau 3) et que bloque en grande partie l'actinomycine D, dénotent une participation prépondérante de la RNA-polymérase dépendant du DNA (HURWITZ et coll., 1962; BERG et coll., 1962). La présence de cette enzyme a été confirmée par son extraction et sa purification selon la méthode de CHAMBERLIN et BERG, 1962. L'enzyme purifiée montre une dépendance complète à l'égard des quatre Ribose nucléoside-triphosphates et du DNA (PELMONT et coll., 1963).

TABLEAU 3

Incorporation de CTP et P³² dans diverses conditions par la fraction P₁.

Le système complet d'incubation comprend (volume final / ml Tris pH 7,3 : 100 μ M; Mg⁺⁺ : 3 μ M; Mn⁺⁺ : 3 μ M; ATP, GTP, UTP : 0,25 μ M chacun; acides aminés au total 106 μ M (même mélange que pour la figure 1); fraction P₁ correspondant à 100 μ g de protéines environ, suspendue dans milieu 10 (KCl 400 μ M). A la fin de l'incubation les aliquots sont précipités au TCA 5 % avec 2 mg de sérum albumine comme entraîneur. Le précipité est lavé 5 fois par le TCA 5 %, repris dans l'ammoniaque et étalé pour comptage. CTP- α -³²P préparé selon HURWITZ, 1959.

	m μ M CTP incorporé à 30°C pendant 30 min.	pourcentage par rapport au système complet
Système complet	6,0	100
Sans ATP	2,2	37
" GTP	4,3	72
" UTP	3,2	53
" Mn ⁺⁺	3,9	65
Système complet + 10 μ g DNase	3,3	55
+ 20 μ g actinomycine	2,1	35
+ 1 μ g RNase	1,6	27
+ 2 μ M phosphatase	0,6	10

Nous avons examiné la nature du RNA formé par la technique du gradient de saccharose. Le RNA total du mélange de réaction incubé 30 minutes à 30 °C a été extrait par plusieurs méthodes : 1) agitation 30 minutes en présence d'un volume de phénol saturé d'eau et neutre, à 4 °C; 2) traitement bref à la DNase (10 min. 1 μ g/ml) suivie d'une extraction par le duponol 1 % pendant 2 minutes à 70 °C; 3) combinaison des deux méthodes. Le RNA précipité de la solution aqueuse par 2 volumes d'éthanol à -20 °C est lavé 5 fois à l'éthanol 70 % et repris dans un petit volume de tampon Tris à pH 7,3, l'ensemble des opérations, afin de limiter au maximum les dégradations accidentelles, étant conduit aussi simplement et rapidement que possible. Après sédimentation en gradient de saccharose 4-18 % tamponné à pH 7,2 (Tris 0.01 M, Mg⁺ 0.001 M) 14 heures à 25 000 t/m dans le rotor SW 25 toute la radioactivité est rassemblée dans une région ne sédimentant qu'avec une constante au plus égale à 10 S. Les fractions 16 S et 23 S du RNA de type ribosomal ne sont pas nettement radioactives. Il est donc évident, que le RNA néoformé et isolé à un instant donné possède dans son ensemble une faible masse moléculaire, sans que l'on puisse exclure à priori l'existence d'un « turnover » rapide au sein de cette fraction (fig. 7).

Comme il fallait s'y attendre l'induction de la β -galactosidase ou celle de la phosphatase alcaline est strictement dépendante de la synthèse d'un acide nucléique, comme il ressort des expériences avec l'actinomycine, la DNase, la RNase et les nucléoside triphosphates, substrats enzymatiques de la RNA polymérase (tableau 1). On pouvait se demander si le phénomène d'induction *in vitro* était suffisamment durable en fonction du temps, autrement dit si la fraction P₁ conservait son activité pendant plusieurs jours. Les expériences réalisées montrent que l'induction disparaît très vite quand la fraction P₁ est conservée dans la glace. Nous avons alors recherché les causes de cette inactivation et constaté que le degré d'inactivation dans le temps est bien moindre quand la fraction P₁ est conservée conjointement avec tous les substrats nécessaires pour l'induction : acides aminés, nucléosides triphosphates, ions et surtout acides nucléiques des souches constitutives ou inductibles préalablement induites. On peut voir (tableau 4) que la fraction P₁, même après 72 heures de conservation à 0° en présence des facteurs cités, retient entre 50 et 70 % de l'activité présente initialement. Dans le même but nous avons essayé l'effet des acides aminés, des nucléosides triphosphates et de l'inducteur sur l'induction par une fraction P₁ préalablement incubée en l'absence du facteur considéré. Nous avons constaté qu'une incubation durant un court délai à 30 °C en l'absence des acides aminés ou des nucléoside-triphosphates pouvait entraîner

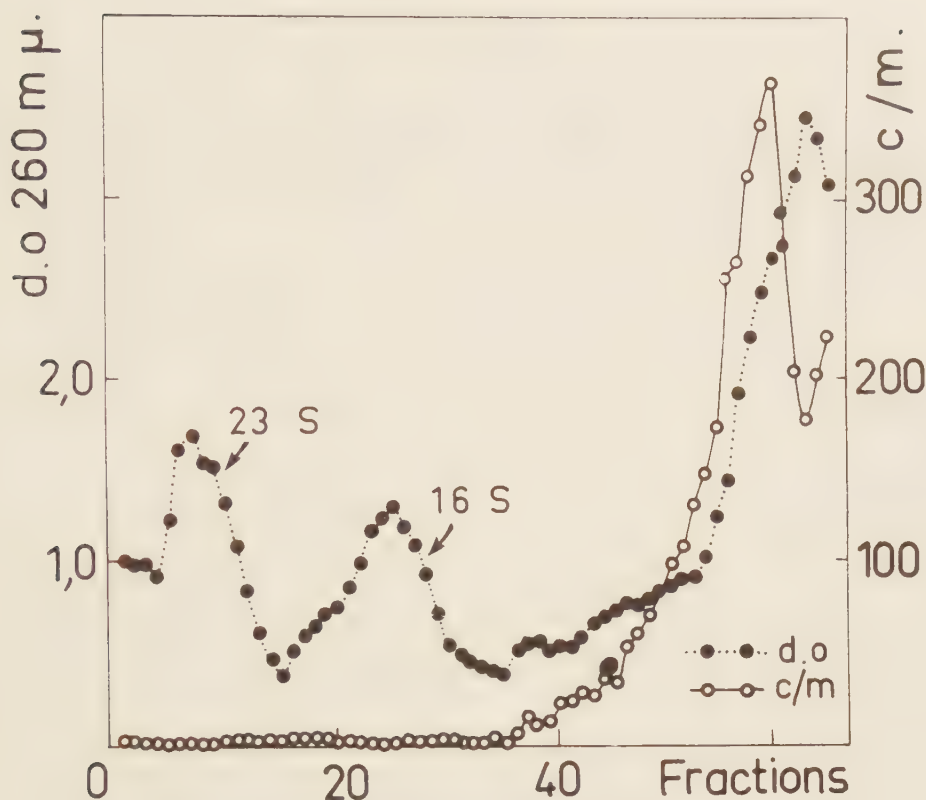


FIG. 7

Sédimentation en gradient de saccharose 4-18 % (25 ml) du RNA synthétisé *in vitro*, 14 heures à 25 000 t/m. Le RNA est extrait du mélange d'incubation (contenant CTP-³²P, 10 ml, 30 min. à 30°) par le phénol (+ duponol 1 %) à froid, précipité par 2 volumes d'éthanol absolu (—20°); le précipité est lavé 3 fois par l'éthanol 70 %, redissous dans le Tris 10⁻³ M, pH 7,3, Mg 10⁻⁴ M. De chaque fraction (7 gouttes), un aliquot est prélevé pour mesure de densité optique, le restant est précipité par le TCA 5 % avec 2 mg de sérum-albumine comme entraîneur. Le précipité est lavé 1 fois par le TCA 5 % avant d'être repris dans l'ammoniaque et étalé pour comptage.

une chute plus ou moins considérable de l'activité du système. Avec certaines préparations l'incubation pendant 2 minutes à 30 °C du système muni de tous les substrats excepté les acides aminés suffit pour faire disparaître l'induction *in vitro* de la β -galactosidase (tableau 4).

RÔLE DES ACIDES NUCLÉIQUES DANS L'INDUCTION

La synthèse induite de la β -galactosidase se montre sensible à la RNase (10 μ g/ml) chauffée 10 minutes à 80 °C avant emploi) et à la DNase (10 μ g/ml, traitée par la bentonite). La diminution de la synthèse d'enzyme et l'incorporation des acides aminés (60 à 70 % environ dans les deux cas) s'accroît si le système est préincubé dans la glace en présence de la nucléase avant son transfert dans le bain-marie à 37 °C. L'action de la RNase et de la DNase sur la fraction P₁ est donc plus lente et plus difficile qu'avec les systèmes ribosomaux proprement dits effectuant des incorporations d'acides aminés (TISSIÈRES et coll., 1961). Cette propriété est actuellement à l'étude et serait en rapport avec les caractéristiques structurales de la fraction P₁.

TABLEAU 4

Stabilité de l'induction « in vitro » de la β -galactosidase.

A — Effet des acides nucléiques totaux (AN) et du RNA 3 300 sur la stabilité de la fraction P_1 .

B. — Effet de l'omission de certains substrats pendant de brèves périodes d'incubation à 30 °C.

A : Le mélange de réaction est incubé aussitôt ou après un délai de conservation dans la glace. B : Le système est incubé brièvement à 30° en l'absence de certains substrats ceux-ci étant ajoutés, l'incubation a lieu normalement à 37 °C - AN : acides nucléiques totaux; RNA 3 300 : RNA extrait à partir de la fraction P_1 traitée par la DNase et le Duponol; AA : mélange d'acides aminés; XTP : nucléoside-triphosphates; PEP, Pkinase : phosphénol-pyruvate et pyruvate kinase.

A	Activité initiale Temps d'incubation en min.		Activité après 72 h. à 0° avant incubation Temps d'incubation en min.	
	60	120	60	120
<u>1ère expérience</u>				
Sans AN	480	1030	24	121
+ AN 3300 (50 μ g DNA, 16 μ g RNA/ml)	720	1600	220	400
	Activité initiale		Activité après 24 h. à 0° avant incubation	
<u>2ème expérience</u>	90	180	90	180
Sans RNA	37	475	19	268
+ RNA 3300 (50 μ g/ml)	222	830	202	925
B			Temps d'incubation	
			90	180
Système incubé d'emblée complet			311	641
10 min. à 30° sans XTP			223	432
" sans AA + XTP			72	119
" sans AA + XTP			11	32
+ PEP + PKinase				

Plus tranchée est l'action exercée par l'actinomycine D. Cet antibiotique ajouté sans préincubation à raison de 16-30 μ g/ml au mélange de réaction inhibe totalement toute synthèse induite de β -galactosidase ou de phosphatase alcaline. L'incorporation des acides aminés marqués étudiée parallèlement tombe à des valeurs négligeables. L'actinomycine D est connue comme agent bloquant toute utilisation du DNA par la RNA polymérase, par suite d'une association moléculaire contractée entre l'antibiotique et la RNA polymérase (REICH et coll., 1963; HURWITZ et AUGUST, 1963). Il est donc clair que la synthèse de l'enzyme active est en totalité réglée par le DNA. Le fait que l'actinomycine D bloque parallèlement une grande partie de l'incorporation des nucléosides triphosphates dans les mêmes conditions est compatible avec l'hypothèse selon laquelle la synthèse de protéine au sein de la fraction P_1 serait liée à une formation préalable de RNA messenger. La quantité de RNA messenger spécifique de la β -galactosidase présente dans la fraction P_1 au temps zéro de l'incubation aurait des valeurs négligeables.

Afin d'examiner ce phénomène de plus près, nous avons été conduits à ajouter l'antibiotique au mélange de synthèse à des temps variables après le départ de la réaction. Le tableau 5 indique la quantité de β -galactosidase synthétisée et l'incorporation des acides aminés obtenue lorsque l'actinomycine a été ajoutée 1,30'', 3, 6, ... 36 min. après le départ de la réaction. On peut constater que l'actinomycine ajoutée

TABLEAU 5

Synthèse de protéines dans la fraction P₁ après addition d'actinomycine D.

Chaque système est préincubé à 30° (β -galactosidase) ou 37° (phosphatase alcaline) en l'absence d'actinomycine (20 μ g/ml) pendant les temps indiqués. Conditions comme dans les figures 1 et 2.

Temps d'incubation avant addition d'actinomycine D	Unités, par mg de protéines totales, d'enzyme formée à 37°			m μ M de méthionine ¹⁴ C incorporées par mg de pro- téines totales à 37°C		
1ère expérience : β -galactosidase (souche 200 PS)	Temps d'incubation (minutes)					
	60	120	180	60	120	180
0	0	0	5	0,19	0,50	0,85
1 min. 30	19	28	42	0,28	0,55	1,00
3 min.	18	35	52	0,55	1,22	1,41
6 min.	19	37	61	0,56	1,41	1,89
12 min.	26	38	70	0,85	1,60	2,16
24 min.	26	64	94	0,87	1,70	2,45
36 min.	40	61	95	0,83	1,89	2,82
sans addition	47	160	278	1,42	3,20	4,85
2ème expérience phosphatase alcaline (souche K 10)						
0	495	630	740	0,31	0,51	0,73
3	510	820	1110	0,39	0,93	1,16
6	530	950	1400	0,48	0,89	1,38
12	570	1110	1600	0,72	1,13	1,64
21	630	1300	2000	0,83	1,47	2,20
30	680	1400	2200	1,05	1,83	2,54
sans addition	730	2100	3600	1,53	3,20	4,61

seulement 90 secondes après le début de la réaction n'empêche pas la synthèse ultérieure d'une quantité importante d'enzyme. L'expérience parallèle effectuée sur l'incorporation des nucléoside triphosphates confirme l'action inhibitrice immédiate de l'actinomycine sur cette incorporation (NISMAN, PELMONT et coll., 1963) (fig. 8 et 9).

Une incubation pendant des temps extrêmement courts en absence d'actinomycine a donc suffi pour dégager partiellement le système de sa dépendance vis-à-vis du DNA, ce qui nous permet de formuler les propositions simples suivantes : 1) La synthèse induite est entièrement sujette à la transcription génétique contenue dans le DNA. 2) Cette transcription s'effectue dans la fraction P₁ par la synthèse d'un RNA messenger spécifique synthétisé très rapidement au début de la réaction. 3) Dans la mesure où le RNA spécifique serait un intermédiaire absolument nécessaire dans la transcription génétique, il se comporterait dans la fraction P₁ comme un maillon relativement stable dont l'utilisation est encore possible longtemps après sa formation. Les mêmes expériences, répétées au moyen de la synthèse de la phosphatase alcaline par la souche K 10, ont confirmé l'existence de ce phénomène qui semble ainsi posséder une valeur générale pour le système considéré. Nous noterons cependant avec intérêt que bien que l'actinomycine ajoutée très tardivement au cours de la réaction, lorsque l'incorporation des triphosphates est tombée à un niveau très faible, provoque encore une inhibition de la synthèse ultérieure d'enzyme active. Cette observation semblait indiquer l'existence d'une action secondaire exercée par l'actinomycine sur la marche ultérieure de la protéosynthèse.

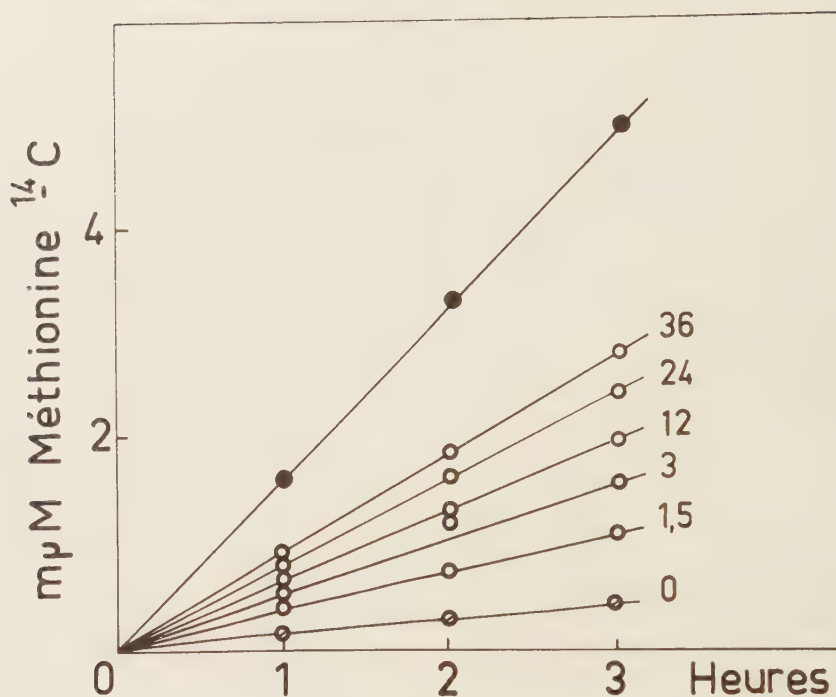


FIG. 8

Incorporation de L-méthionine ^{14}C quand l'actinomycine D est ajoutée après différents délais, indiqués en minutes en face de chaque tracé; cercles noirs: incorporation en absence d'actinomycine. Conditions identiques à celles du tableau.

Le rôle du RNA informationnel dans la synthèse *in vitro* des enzymes est démontré de façon directe par l'addition de RNA extraits et purifiés par la méthode au phénol déjà citée à partir de la fraction P_1 de plusieurs souches. Dans les expériences exposées par le tableau 6 (souche inductible 200 PS Flac⁺) le RNA est ajouté à un système dont le DNA a été bloqué par l'actinomycine D. Le système témoin,

TABLEAU 6

Synthèse de la β -galactosidase par la fraction P_1 de la souche 200 PS F Lac⁺ en présence d'actinomycine D (16 $\mu\text{g}/\text{ml}$) et en fonction du temps d'incubation.

Résultats exprimés en unités par mg de protéines totales; conditions comme dans la figure 1 et dans le texte: les fractions 4-8S, 10-16S et 23S ont été isolées par gradient de saccharose. Chaque échantillon, incubé le temps indiqué, a reçu 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de CAL puis a été post-incubé 12 h à 37 °C.

	Expérience n° 1			Expérience n° 2		
	60 mn.	120 mn.	180 mn.	60 mn.	120 mn.	180 mn.
P_1 + actinomycine						
Sans addition.....	0	0	0	8	16	16
+ RNA PS induit.....	8,0	32,0	60,0	-	-	-
+ " fraction 4-8 S...	2,4	4,4	8,0	-	-	-
+ " fraction 10-16 S...	0	0	0	-	-	-
+ " fraction 23 S.....	0	0	0	-	-	-
+ RNA PS non induit.....	0	0	0	8	16	16
+ RNA 3 300 (i-Z ⁺).....	1,6	6,4	17,0	32	140	440
+ RNA Y 23 (i-Z ⁻).....	-	-	-	4	16	16

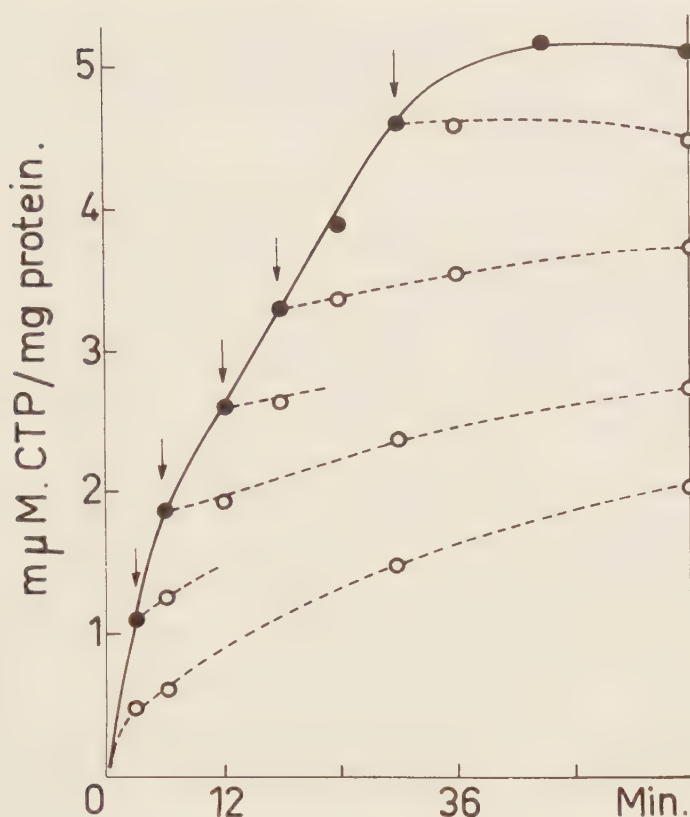


FIG. 9

Effet de l'actinomycine D sur l'incorporation de CTP- α - 32 P dans les conditions du tableau 3; cercles noirs : incorporation sans actinomycine; les flèches indiquent divers moments d'addition de l'actinomycine et les cercles blancs montrent l'incorporation ultérieure à chaque addition.

qui ne reçoit pas de RNA, mais contient l'antibiotique ne synthétise aucune β -galactosidase. L'addition dans un autre système de RNA extrait de la fraction P_1 provenant de la souche 200 PS induite à l'état de protoplastes s'accompagne d'une synthèse d'enzyme malgré la présence de l'antibiotique, à condition que l'inducteur (IPTG) soit présent. Le RNA isolé à partir de la souche 200 PS non induite est en général

TABLEAU 7

Effet des acides nucléiques sur la synthèse de β -galactosidase par la fraction P_1 de la souche 200 PS induite à l'état de protoplastes.

Résultats exprimés en unités par mg de protéines après déduction du niveau de base de l'enzyme (8 500 U/mg) RNA ajouté: 30 μ g environ; échantillon post-incubés comme dans le tableau 7.

	Temps d'incubation (en minutes)		
	60	120	240
Sans actinomycine	1500	4300	4300
Avec actinomycine (20 μ g/ml)	425	610	1000
" " + RNA PS non induit	425	425	1470
" " + RNA 3300	900	1470	5260
" " + RNA 3300 (fractions 4-8S)	760	1110	2440

dépourvu d'activité. Afin d'éliminer toute sorte d'erreur provenant de la variabilité des préparations, l'expérience a été répétée utilisant plusieurs préparations de RNA de chaque souche, extraites soit par le phénol, soit par le duponol 1 % à 70 °C après traitement à la DNase. Seules les préparations provenant des souches constitutives ou induites se sont montrées actives, le RNA d'origine constitutive étant en général le plus actif (tableau 7).

L'examen de la taille du RNA responsable de cette activité a été obtenu par fractionnement des RNA provenant de la souche constitutive 330 ou de PS préalablement induite, sur un gradient de sucrose dans les mêmes conditions que plus haut. A l'aide des repères formés par la présence des pics 16 S et 23 S on a groupé les fractions en trois ensembles contenant : 1) les produits sédimentant avec une constante de sédimentation de 0 à 10 S, 2) les produits ayant une constante de 8 à 16 S, 3, et les produits ayant une constante supérieure à 16 S. Les trois fractions sont alors précipitées à l'éthanol et reprises dans un volume de tampon Tris (pH 7,3) calculé pour avoir une concentration de 30 µg/ml et essayées séparément, sur un système bloqué par l'actinomycine, comme mentionné plus haut. La presque totalité de l'activité récupérée est située dans la plus légère des trois fractions, dont le RNA sédimente avec une constante au plus égale à 8 S. Le RNA moyen (8-16 S) n'est que faiblement actif. Le plus lourd est sans activité (tableau 6).

Cette étude a été répétée et confirmée en étudiant la synthèse de phosphatase alcaline. On a centrifugé dans un gradient de sucrose avec des conditions identiques le RNA total de fraction P₁ de souche constitutive C 2 (R₁-R₂+P⁺) pour la phosphatase alcaline.

L'addition de RNA de sédimentation définie plus haut à un système de synthèse indique encore plus clairement que seul le RNA de faible masse moléculaire permet la formation de la phosphatase alcaline (tableau 8).

TABLEAU 8
*Effet des RNA sur la synthèse « in vitro » de la phosphatase alcaline
(souche K 10)*

Mélange d'incubation comme dans la figure 2. L'actinomycine est ajoutée 45 min. avant l'incubation (20 µg/ml). Le RNA C4 a été fractionné sur gradient de saccharose dans les conditions décrites dans le texte pour les RNA 200 PS et 3 300; RNA K 10: RNA extrait à partir de la fraction P₁ de E. K 10 type sauvage (cultivé en l'absence de phosphate minéral).

Système	acides nucléiques µg/ml		Unités d'enzyme formées par mg de protéines
	RNA	DNA	
I - <u>Sans actinomycine</u>			
Système sans acides nucléiques totaux C4	12	5	2500
			sans incubation 520
Système + acides nucléiques totaux C4	105	61	4600
Système + RNA total C4	1020	5	7100
Système + RNA C4 (23S)	250	5	2400
Système + RNA C4 (16S)	130	5	2600
Système + RNA C4 (8-4S)	650	5	4200
Système + RNA K10 (total)	880	5	3100
II - <u>Avec actinomycine</u>			
Système sans acides nucléiques totaux C4	12	5	660
Système + acides nucléiques totaux C4	105	61	760
Système + RNA total C4	1020	5	1910
Système + RNA C4 (8-4S)	650	5	1300
Système + RNA K10 (total)	880	5	740

Le RNA de transfert d'*E. coli* préparé par la méthode citée s'est montré pratiquement dépourvu de toute activité sur la fraction P_1 . Nous pouvons en déduire que la synthèse induite des deux systèmes étudiés utilise effectivement un RNA « messenger », que ce RNA soit synthétisé de nouveau dans la préparation ou apporté de l'extérieur. L'utilisation de l'actinomycine permet sans doute à de petites quantités de RNA informationnel spécifique de manifester leur présence lorsque toute transcription à partir du DNA est arrêtée.

LE SITE DE L'INDUCTION

Le traitement par sonnation (Raytheon 10 KC à puissance maxima) de la fraction P_1 entraîne une chute d'activité pour la synthèse induite de β -galactosidase ou de phosphatase alcaline. Cette synthèse reste cependant encore possible même après plus de 5 minutes de traitement.

L'opération entraîne une solubilisation partielle de la préparation et une chute de viscosité : la centrifugation à 20 000 g pendant 10 minutes permet de recueillir un sédiment de fragments de membranes encore identifiables par microscopie en contraste de phase. Dès la première minute de traitement le taux de protéines de la fraction initiale libérées dans le surnageant s'élève rapidement à 70 %, et ne s'élève ensuite que lentement tandis qu'une partie des acides nucléiques est détruite par ce traitement. Dans les expériences citées plus loin nous avons utilisé une sonnation de durée comprise entre 2 et 4 minutes; le sédiment est suspendu de nouveau dans un volume équivalent de milieu 1 (Saccharose 0,5 M, Tris 0,02 M, $MgSO_4$ 0,015 M, pénicilline 2 000 U/ml).

L'activité du sédiment et du surnageant après centrifugation se répartit comme suit : le surnageant est pratiquement inactif pour la synthèse de l'enzyme et n'incorpore que très faiblement les acides aminés

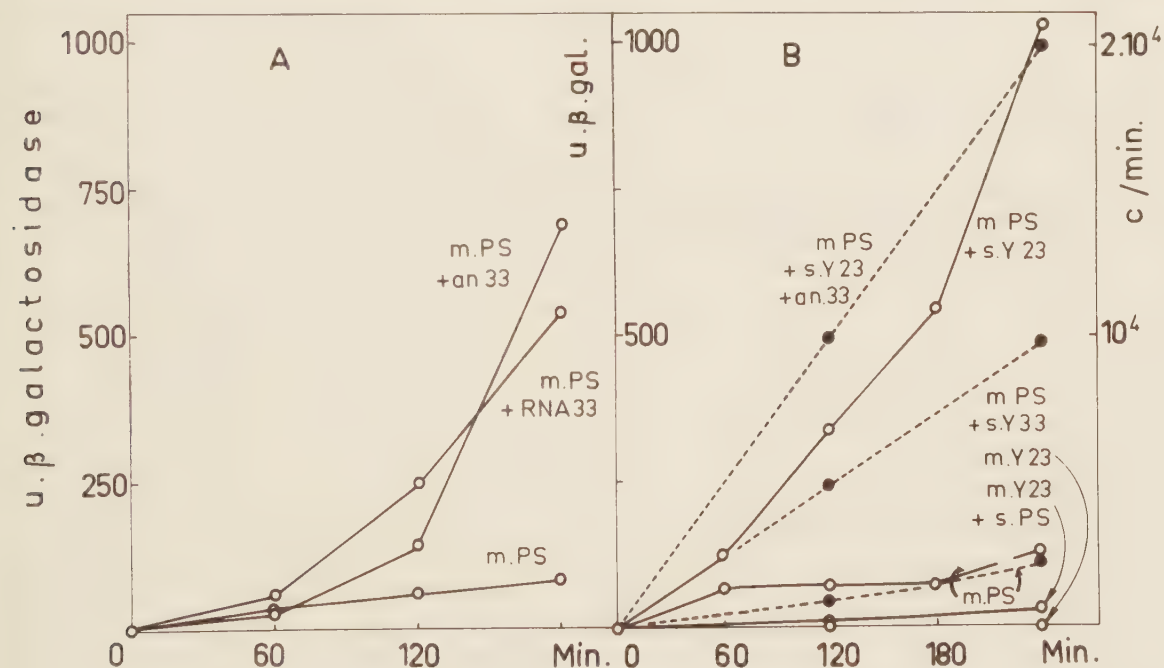


FIG. 10

Effet des acides nucléiques sur une fraction de membranes obtenue après 3 minutes de sonnation (voir texte); A) acides nucléiques de la souche 3 300 (50 μ g de DNA, 17 μ g de RNA). B) Recombinaison membranes-surnageant entre les souches 200 PS (*i⁺z⁺*) et délétion Y 23; les lignes pointillées indiquent l'incorporation de méthionine-¹⁴C; m: membranes; s: surnageant; a. n.: acides nucléiques.

marqués; plus de 80 % de la RNA polymérase se trouve dans cette fraction. Le sédiment contient une certaine activité de synthèse résiduelle très variable d'une préparation à l'autre; il est encore inductible *in vitro* dans les conditions déjà décrites.

La recombinaison des deux fractions (sédiment et surnageant) multiplie de 3 à 10 fois l'incorporation des acides aminés, la synthèse de β -galactosidase ou de la phosphatase alcaline par rapport à la suspension de fragments de membranes. Parmi les facteurs responsables de cette complémentation on peut proposer : 1) l'existence de facteurs enzymatiques indispensables dont le niveau de saturation dans les membranes ne serait plus atteint; parmi ceux-ci figureraient la RNA polymérase et des acides nucléiques; 2) la présence dans le surnageant d'éléments structurés détachés de la membrane, actifs dans la protéosynthèse mais dont l'activité ne peut s'exprimer qu'en fonction des fragments de membrane.

L'expérience suivante montre le caractère spécifique des potentialités des fragments de membranes. Une recombinaison croisée est effectuée entre fragments de membranes et surnageants provenant de deux souches distinctes et préparés dans des conditions identiques. Dans l'exemple présenté ici les souches utilisées sont la 200 PS, la délétion Y 23 et la souche 20 SO. Les deux dernières souches sont incapables de synthétiser la β -galactosidase : on voit (fig. 10) que les fragments de membrane de ces deux souches ne peuvent synthétiser la β -galactosidase même en présence du surnageant de la souche PS. Inversement un surnageant provenant soit de la souche Y 23, soit de la 20 SO stimule l'activité des fragments de membrane de 200 PS en présence de l'inducteur. Comme nous n'avons pu obtenir de la fraction P_1 ou des membranes isolées de la souche Y 23 la moindre synthèse de β -galactosidase, même après addition d'acides nucléiques contenant l'information génétique convenable, il est clair que cette information, pour une raison qui ne nous est pas connue, ne peut s'exprimer dans un système membranaire génétiquement incompetent, même en l'absence d'un répresseur éventuel de la synthèse de l'enzyme (la souche Y 23

TABLEAU 9

Effet des RNA spécifique et de la RNA-polymérase sur la synthèse de la β -galactosidase par un système reconstitué (fragments de membranes + surnageant).

La RNA-polymérase a été extraite du surnageant de fraction P_1 200 PS sonnée et purifiée sur colonne de cellulose DEAE selon CHAMBERLIN et BERG, 1962.

L'enzyme est dosée après 12 h. d'incubation supplémentaire à 37° avec 0,5 mg/ml de chloramphénicol, RNA-polymérase : environ 20 U/ml (5).

Unités de β -galactosidase par milligramme
de protéines de membranes
Temps d'incubation (minutes)

	30.	60.	120.	180.
1ère expérience (membranes + leur surnageant) :				
1. Sans addition.....	3,2	12,0	35,0	117,0
2. + 400 μ g/ml RNA PS non induit .	4,1	11,4	33,4	110,1
3. + 400 μ g/ml RNA 3300 ($i^- Z^+$).....	7,7	15,7	48,0	205,2
2ème expérience (membranes seules) :				
1. Sans addition.....		6,7	19,2	68,5
2. Préincubé 30 mn avec RNA-polymérase puis membranes et 16 μ g/ml actinomycine.....		0,8	2,5	9,4
3. Id. mais non préincubé.....		0	0	0,3

étant i-). Le surnageant contient par contre des facteurs non spécifiques utilisables par les membranes en présence de l'inducteur.

Des résultats similaires sont obtenus en remplaçant la sonnation de la fraction P₁ par un passage répété 60 à 100 fois à travers une seringue de 100 ml à large ouverture. Ce simple traitement mécanique est suffisant pour provoquer le même effet de dissociation. Il est possible que la RNA polymérase constitue un des facteurs non spécifiques contenu dans le surnageant. Le rôle de cette enzyme en tant que générateur de RNA informationnel est clairement mis en évidence comme suit : on ajoute au mélange complet de réaction avant addition des fragments de membrane 20 Unités environ de RNA polymérase purifiée selon la méthode de Berg et une petite quantité (100 µg) de DNA de la souche constitutive 3300. Le mélange contenant la polymérase est incubé 30 minutes; au terme de cette période, les fragments de membrane en suspension sont ajoutés ainsi que 30 µg/ml d'actinomycine D, afin de bloquer tout le DNA : une synthèse de β-galactosidase et une incorporation d'acides aminés appréciables ont lieu malgré la présence de l'antibiotique (tableau 9). Dans le système témoin où l'actinomycine D a été ajoutée en même temps que la RNA polymérase, aucune synthèse d'enzyme n'a lieu et l'incorporation des acides aminés est très faible. Il est visible là encore que non seulement la RNA polymérase purifiée à partir du système P₁ est bien active en tant que génératrice de RNA informationnel, mais que celui-ci persiste suffisamment longtemps dans la préparation pour permettre une augmentation ultérieure régulière de la β-galactosidase présente après plusieurs heures. Ces expériences sont en accord avec celles réalisées par EISENSTADT et NOVELLI (1963) sur un système provenant de bactéries induites.

Les membranes bactériennes isolées par sonnation ou par passages répétés à travers la seringue constituent un matériel de choix pour l'étude des effets des acides nucléiques sur la synthèse induite. Des quantités de l'ordre de 30 µg de DNA et de RNA par ml (extrait de la fraction P₁ de souches convenables) se montrent actifs même lorsque le système n'est pas bloqué par l'actinomycine. Les meilleures réponses sont obtenues par addition progressive de RNA au cours de la période d'incubation (tableau 10).

TABLEAU 10

Effet des RNA ajoutés pendant l'incubation sur la synthèse de β-galactosidase induite.

Les RNA sont ajoutés au système correspondant en plusieurs portions successives (200 µg/ml chacune), au départ de l'incubation, et après 60 et 120 minutes. Les aliquots prélevés à 180 minutes ont donc reçu trois fois de suite le même RNA. Dans le système témoin le tampon Tris 10⁻² M, Mg 10⁻³ M est ajouté en quantités successives équivalentes. Echantillons post-incubés comme dans le tableau 7. Résultats exprimés en unités par mg de protéines.

Temps d'incubation (minutes)	Additions au système			
	tampon Tris Mg ⁺⁺	RNA PS non induit	RNA 3 300	Système complet sans IPTG
30	320	282	341	0
60	704	560	800	0
120	784	990	1 600	0
180	1 550	1 328	2 400	0

L'inducteur est dans tous les cas nécessaire à l'expression de la RNA polymérase ou des acides nucléiques rajoutés.

Bien que manifeste, le rôle des acides nucléiques et de la polymérase ne semble pouvoir expliquer dans sa totalité l'effet du surnageant sur les fragments de membranes. Notre attention s'est portée sur les possibilités d'interactions plus complexes au niveau de la membrane bactérienne considérée comme site essentiel de l'élaboration des macromolécules spécifiques. Les expériences préliminaires concernant ce phénomène semblent indiquer qu'il en est bien ainsi.

Dans un premier temps les fragments de membrane sont préparés par sonnation ou passage dans

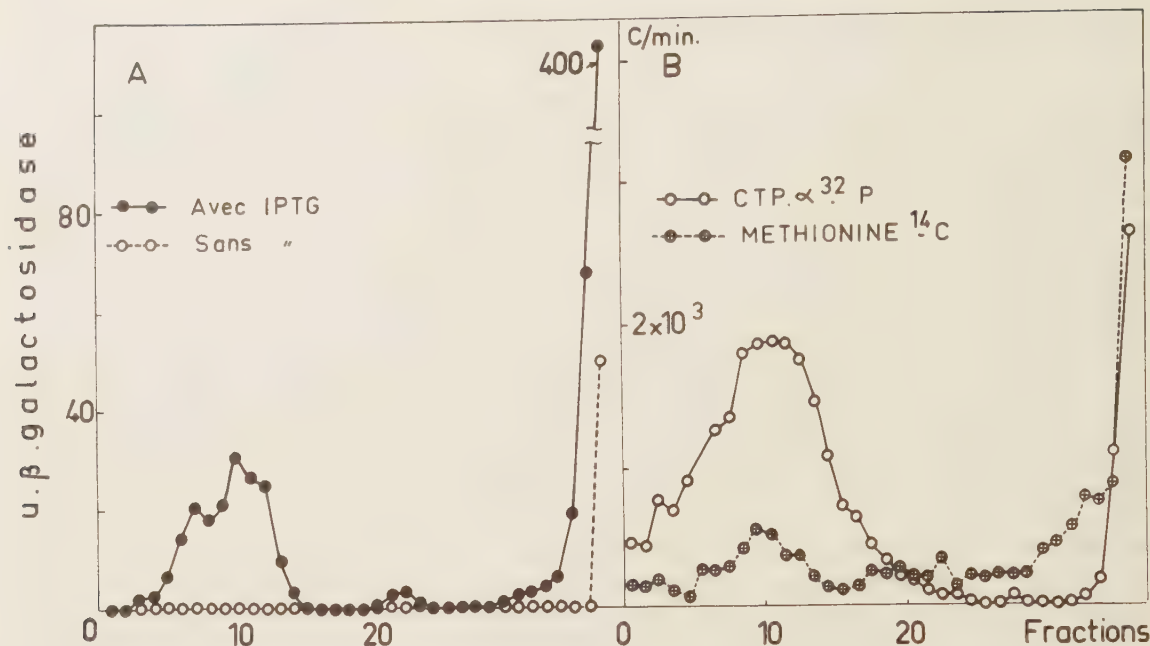


FIG. 11

Sédimentation en gradient de saccharose des fragments de membranes. Conditions dans le texte. A. Synthèse de β -galactosidase par les fractions incubées 4 h à 37°C puis 10 h à 37° en présence de 0,5 mg/ml de chloramphénicol. Même méthode de dosage que dans (1)2. B. Incorporation de méthionine- 14 C après 4 h à 37° (mélange contenant au total 0,4 μ M/ml de méthionine avec 7,0 μ C/ μ M) et de CTP- α - 32 P après 2 h à 37° (au total 0,25 μ M de chaque triphosphate, et $2 \cdot 10^5$ c/m CTP- 32 P). Les dosages sont corrigés pour l'inhibition exercée par le saccharose.

la seringue et suspendus dans un milieu 1 ramené à 6 % en saccharose. Les membranes sont déposées sur un gradient de saccharose 10 % - 70 % (25 ml) et centrifugées dans les conditions de la figure 11.

Chaque fraction (10 gouttes) est reçue dans un tube contenant : 1,3 ml du mélange de protéine, 20 μ g de DNA 200 PS et 0.05 ml de la fraction surnageante initiale. L'activité de synthèse des différentes fractions est suivie par incubation des tubes de séries parallèles : 1) synthèse de β -galactosidase avec ou sans IPTG; 2) incorporation des acides aminés marqués; 3) incorporation de CTP- α - 32 P. La figure met en évidence le parallélisme entre les trois types d'activité et montre l'existence d'au moins deux fractions à sédimentation rapide décelables par l'activité enzymatique et l'incorporation des acides aminés : l'essentiel de la RNA polymérase est attachée à l'une d'elle. Une portion n'est pas sédimentable dans les conditions utilisées; elle contient la RNA polymérase, elle incorpore les acides aminés marqués et forme encore la β -galactosidase en présence d'IPTG. L'activité décelée dans le matériel sédimenté au fond du tube de gradient est négligeable.

Dans des expériences ultérieures nous avons vérifié qu'un traitement mécanique quelconque, notamment une homogénéisation à la seringue ou une agitation violente dans un milieu à base de saccharose libère constamment des particules restant en suspension après 10 minutes à 20 000 x g, mais entièrement sédimentées après 20 minutes à 105 000 x g. Ces particules ont par elles-mêmes une activité faible et sont très imparfaitement inductibles *in vitro*; leur composition moyenne relative est : DNA : 0,11; RNA : 0,31; protéines : 1. L'addition d'une petite quantité de fragments de membranes provoque une très forte stimulation de cette synthèse induite, ainsi que l'incorporation des acides aminés (tableau 11).

Ce phénomène dont nous poursuivons l'étude, semble indiquer les faits suivants. 1) Les particules actives dans la synthèse des enzymes sont des sous-unités de masse supérieure à celle des ribosomes, constituées par un complexe DNA-RNA-protéines. 2) Ces particules ne possèdent une efficacité réelle

TABLEAU 11

*Recombinaison des fragments de membranes avec les particules légères
ne sédimentant pas dans le gradient de saccharose (voir texte).*

La fraction P_1 (200 PS) est sonnée à 3 minutes, centrifugée 25 min. à 35 000 g (Centrifugeuse Servall). Le sédiment est repris dans le milieu 1, centrifugé à 10 minutes à 14 000 x g; le surnageant constitue la suspension des « particules légères », lesquelles sont complètement sédimentées en moins de 20 min. à 105 000 g. Une partie de ces particules s'est détachée des fragments de membranes au cours de l'homogénéisation par pipetage ayant suivi la première centrifugation. Le sédiment 14 000 g est resuspendu dans le milieu 1, centrifugé 10 min. à 2 500 g. Le surnageant obtenu est pris comme suspension de membranes.

	Membranes seules.	Particules "légères" seules diluées.	Membranes + les mêmes particules "légères" diluées.
Unités de β -galactosidase après 10 h d'incubation à 37°.	372	8,3	910

dans la synthèse induite qu'en association avec une sous-unité plus grande, constituant de la membrane, et contractent avec elle une liaison facilement dissociable, mais plus ou moins réversible. 3) La membrane règle la synthèse protéique en déterminant l'expression ou non des potentiels génétiques renfermés dans le RNA messager.

RÉPRESSION ET DÉRÉPRESSION DANS LA FRACTION P_1

Si on admet que la synthèse induite d'une enzyme est la conséquence de l'enlèvement d'un répresseur (MONOD et JACOB, 1961) on devrait s'attendre à ce que le facteur P_1 soit l'instrument de choix pour la mise en évidence du répresseur de la β -galactosidase. D'autre part l'étude de la fraction P_1 ou des fragments de membrane obtenus après scission du système par les moyens indiqués a montré que la répression de la β -galactosidase se situe au niveau de la membrane. Un cas de répression par un moyen physique étranger à la présence ou à l'absence d'un inducteur est fourni par la souche E. 103, découverte par HORIUCHI et NOVICK (1961) et montre l'apparition du caractère constitutif partiel pour la β -galactosidase à température élevée (44 °C); à température plus basse (37 °C) la synthèse de β -galactosidase est très faible en l'absence de l'inducteur. L'étude de la fraction P_1 préparée à partir de cette souche montre les mêmes caractères.

TABLEAU 12

Distribution de la β -galactosidase induite (unités par mg de protéines).

Le mélange de réaction (conditions comme dans la figure 1) incubé 45 et 90 min. est centrifugé 10 minutes à 20 000 g après la post-incubation quand il y a lieu. La plus grande partie de l'enzyme reste dans la partie rapidement sédimentable, même après post-incubation.

Distribution de la β -galactosidase induite (unités par mg de protéines)				
Fraction	45 min. d'incubation		90 min. d'incubation	
	Sans post- Incubation	Avec post- Incubation	Sans post- Incubation	Avec post- Incubation
P_1 total	36	68	280	520
Membranes	35	50	275	430
Surnageant	10	15	35	68

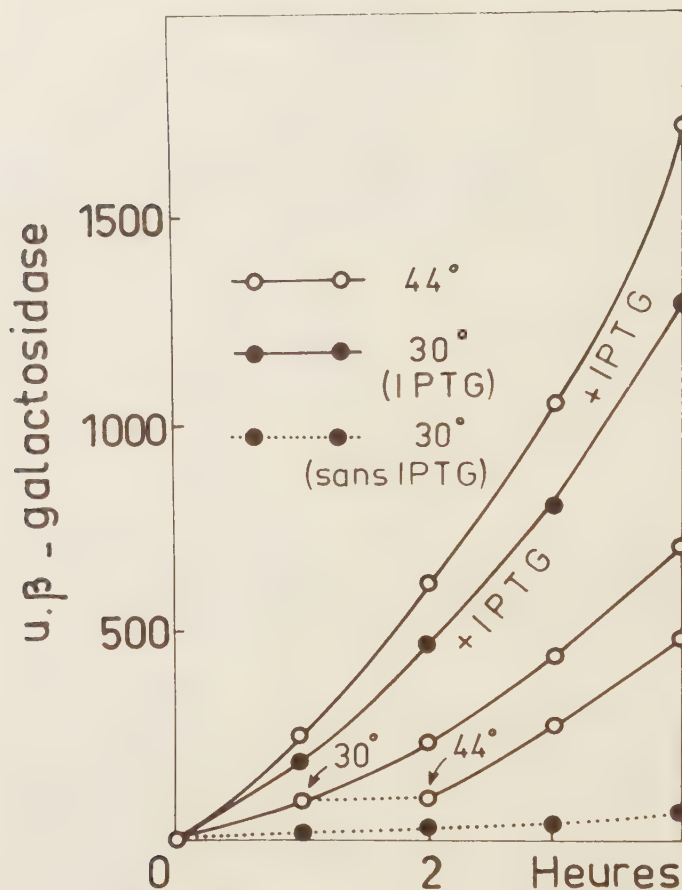


FIG. 12

Synthèse de β -galactosidase par la fraction P_1 de la souche E 103 à 30 °C (avec et sans IPTG) à 44 °C (avec et sans IPTG). Un système sans IPTG est transféré de 44° à 30 °C après 60 minutes (flèche) puis reporté à 44° après 1 heure d'incubation à 30°. Conditions comme dans la figure 1. Unités par mg de protéines totales.

La figure 12 montre la synthèse obtenue après 4 heures par la fraction P_1 incubée avec ou sans inducteur à diverses températures. Le caractère constitutif de la synthèse effectuée à 44 °C apparaît nettement; ce phénomène d'origine thermique est parfaitement réversible. Le retour à une température plus basse arrête instantanément la presque totalité de cette synthèse en l'absence de l'inducteur; un nouveau transfert à 44 °C la restaure avec la vitesse qu'elle possédait au moment du refroidissement (fig. 12). Enfin l'actinomycine bloque à tout moment la quasi totalité de la synthèse. Cette possibilité d'une alternance de marche et d'arrêt déclenchée par un simple changement de température peut recevoir plusieurs explications: 1) Une molécule-répresseur synthétisée par le système serait soit détruite, soit rendue inefficace par l'élévation de température. 2) La synthèse de l'enzyme et sa libération en tant que molécule active achevée serait réglée par un équilibre d'association-dissociation au niveau du site de synthèse, placé sous la dépendance du DNA et très rapidement atteint après un changement des conditions physiques. L'addition de l'inducteur, petite molécule ayant une affinité, déplacerait cet équilibre en faveur d'une dissociation des molécules formées à partir du site membranaire de la synthèse.

Les expériences suivantes essaient de mettre en évidence la transmission d'une répression extérieure à une fraction P_1 placée dans les conditions optimales pour la synthèse de l'enzyme. Le tableau 13 présente la synthèse obtenue par addition au P_1 103 en l'absence d'inducteur d'un grand excès de P_1

TABLEAU 13

Synthèse par les fractions P₁ des souches E102, E103, 200PS isolées ou associées en mélange.

Les résultats sont exprimés par mg de protéines de fraction E 103. La quantité des P₁E 102 et 200 PS, sans activité pour la synthèse de β -galactosidase dans les conditions données, est environ 5 fois supérieure à celle de E. 103 en protéines. Post-incubation comme dans le tableau 7.

unités β -galactosidase par mg de protéines de P₁ E 103

1ère expérience	Temps d'incubation en minutes		
44°C sans IPTG	90	120	180
P ₁ E 102	0	0	0
P ₁ E 103	368	425	657
P ₁ E 102 + E 103	406	480	645
2ème expérience			
44°C sans IPTG	60	120	180
P ₁ 200 PS	0	0	0
P ₁ E 103	122	357	532
P ₁ 200 PS + E 103	149	370	530

de la souche de type sauvage E 102 (inductible pure) A 44 °C et sans IPTG seul E 103 forme l'enzyme : l'addition de E 102 dans ces conditions n'apporte aucune inhibition de la synthèse et tend même à créer l'effet inverse. Le tableau 13 fournit une conclusion analogue par la combinaison des souches PS et E 103. Ce type d'expérience ne nous a pas permis jusqu'à présent de déceler la transmission d'un facteur répresseur d'un site de synthèse à un autre.

unités de β -galactosidase formées par mg de protéine de P₁ 200 PS

	temps d'incubation en min.		
	60	120	180
P ₁ U 178	0	0	0
P ₁ 200 PS	110	354	660
P ₁ 200 PS + P ₁ U 178	210	742	1 810
P ₁ 200 PS + P ₁ U 178 sans IPTG	0	0	0
P ₁ 200 PS + P ₁ U 178 (mélange après addition du chloramphénicol)	122	351	665
m μ M méthionine - ¹⁴ C incorporés			
	temps d'incubation en min.		
		120	180
P ₁ U 178		2,20	4,25
P ₁ 200 PS		0,22	0,36
P ₁ U 178 + P ₁ 200 PS		2,46	4,58

TABLEAU 14

Complémentations entre les fractions P₁ des souches 200 PS et U 178.

Le P₁, U 178, est ajouté en quantité 10 fois supérieure à celle de 200 PS en protéines post-incubation comme dans le tableau 7.

Dans un autre type de combinaison on utilise la fraction P_1 de souche 200 PS en mélange avec un excès de P_1 de la souche U 178; cette souche, aimablement fournie par LENNOX, synthétise constitutivement un monomère de la β -galactosidase dont la polymérisation en enzyme active est impossible, sauf par complémentation avec des monomères normaux (LENNOX, 1963). La synthèse effectuée en présence d'IPTG est nulle. Cet effet ne s'observe plus quand les deux P_1 sont mélangés après addition de chloramphénicol et post-incubés ensemble (tableau 14). Si le P_1 de la souche 200 PS utilise et incorpore en présence d'IPTG un précurseur fabriqué constitutivement par l'autre souche, il apparaîtrait que le site membranaire n'est pas imperméable à la pénétration de macromolécules, ce que l'effet des acides nucléiques indique déjà. Il n'y a donc pas de raison de penser « à priori » que l'échec constaté dans la mise en évidence d'un répresseur transmissible soit dû à un défaut de perméabilité de la structure P_1 à moins que le répresseur soit un facteur intimement lié à un site membranaire donné de la synthèse et n'en puisse être dissocié.

L'EFFET DU GLUCOSE SUR L'INDUCTION

L'addition du glucose (0,001 M) inhibe la synthèse *in vitro* de β -galactosidase, sans toutefois agir sur l'activation de l'enzyme par post-incubation en présence de chloramphénicol. Inversement le glucose stimule très fortement l'induction *in vitro* de la phosphatase alcaline.

Cette dernière particularité nous a engagés à examiner le métabolisme du glucose dans la fraction P_1 . La méthode polarographique, utilisée en collaboration de ZUBRZYCKI, nous a permis de mesurer la consommation d'oxygène en présence de différents substrats (NISMAN, ZUBRZYCKI et coll., 1963). Nous avons pu établir que le glucose n'est pas oxydé par la préparation. La même constatation s'applique au malate, au succinate et au lactate. Par contre le DPNH est oxydé dans les mêmes conditions, en utilisant l'AMP comme accepteur. La formation d'ADP et d'ATP par la réaction a été mise en évidence par incorporation de phosphate inorganique marqué (^{32}P) dans l'ADP et l'ATP, lesquels ont été caractérisés par chromatographie. L'oxydation du DPNH est inhibée par l'ATP et les autres triphosphates et diminuée plus légèrement par les diphosphates. L'inhibition exercée par les triphosphates témoigne d'un renversement de l'équilibre de la phosphorylation oxydative, comme il a été postulé par CHANCE et coll. (1961).

DISCUSSION

La possibilité d'observer *in vitro* l'induction et la répression de la synthèse d'enzymes actifs indique la persistance après l'action lytique ménagée de la digitonine de certaines structures fondamentales. Un tel système constitue un instrument de choix pour suivre l'élaboration de protéines actives ayant une masse moléculaire importante. Plusieurs contrôles démontrent que les effets observés ne sont pas dus à des contaminations cellulaires : 1) l'actinomycine D totalement efficace dans la fraction P_1 est sans action sur les bactéries ou les protoplastes préparés par la pénicilline; 2) la fraction P_1 n'incorpore pas dans les acides nucléiques les nucléotides monophosphates; 3) la préparation n'utilise pas le glucose dans les oxydations.

L'action de l'actinomycine D et le rôle joué par le RNA informationnel montrent que la synthèse *in vitro* a bien lieu de novo après transcription de l'information génétique du DNA copiée par un RNA. La petite taille du RNA actif préparé ou synthétisé dans le système évoque la possibilité d'un codage de chaînes polypeptidiques courtes, de masse moléculaire ne dépassant pas 40 000, susceptibles de s'associer ultérieurement en ensembles plus importants. Une telle conception est conciliable avec les données récentes concernant la structure de la β -galactosidase (ZABIN, 1963; PERRIN, 1963) de la phosphatase alcaline (GARREN et LEVINTHAL, 1962) et de la glutamique-déshydrogénase (FRIEDEN, 1963).

L'existence d'une complémentation nécessaire entre des particules actives et des structures membranaires paraît jouer un rôle essentiel. Elle laisse penser que la formation de la molécule définitive n'est pas réglée seulement par le codage d'une ou de plusieurs séquences primaires, mais dépend également

d'une association des particules actives avec la membrane selon une configuration précise. L'action de l'actinomycine sur une phase de la synthèse postérieure à l'incorporation des acides aminés dans les protéines est une indication selon laquelle le DNA interviendrait aussi dans cette configuration.

La fraction P_1 n'a pas permis d'isoler jusqu'à présent un facteur libre agissant comme répresseur. On pourrait aussi bien supposer que le blocage de la synthèse dans le système à l'état réprimé proviendrait de l'absence d'une dissociation physique dégageant les sites de synthèse qui lui permettent de fonctionner. De nouvelles expériences seront nécessaires pour éclaircir ce point capital. L'ensemble de nos expériences n'est pas en contradiction avec les conceptions admises concernant la synthèse des protéines (LIPMANN, 1963; NOVELLI et coll., 1962; JACOB et MONOD, 1961).

REFERENCES

- BISHOP, D., NISMAN, B., ROCHE, C. (1964). *Biochem. J.* (1964), **90**, 378.
 BOEZY, J., NISMAN, B. (1963) (résultats non publiés).
 BURTON, K., (1956). *Biochem. J.*, **62**, 315.
 CHAMBERLIN, M., BERG, P. (1962). *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, **48**, 81.
 CHANCE, B., HOLLINGER, G. (1961 a). *J. Biol. Chem.*, **236**, 1534, et (1961 b), *Ibid.*, **236**, 1552.
 FEIGELSON, P., NISMAN, B., DEMAILLY, J., PELMONT, J. (1963). (En préparation).
 FRIEDEN (1963). (Communication personnelle).
 GAREN, A., ECHOLS, H. (1962 a). *J. Bacteriol.*, **83**, 297. — (1962 b). *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, **48**, 1398.
 GAREN, A., LEVINthal, C., (1960). *Biochim. Biophys. Acta*, **38**, 470.
 HORIUCHI, T., NOVICK, A. (1961). *Cold Spring Harbor Symp.*, **26**, 247.
 HURWITZ, J. (1959). *J. Biol. Chem.*, **233**, 2351.
 HURWITZ, J., AUGUST, J. T. (1963). *Progress in Nucleic Acid Research*, vol. 1, 59, Academic Press Ed. New York.
 JACOB, F., MONOD, J. (1961). *J. Mol. Biol.*, **3**, 318.
 LENNOX, E. (1963). (Communication personnelle).
 LIPMANN, F. (1963). *Progress in Nucleic Acid Research* (Vol. I), 135, Academic Press Ed., New York.
 LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A., RANDALL, R. J. (1951). *J. Biol. Chem.*, **193**, 265.
 MEJBAUM, W. (1939). *Z. Physiol. Chem. Hoppe Seyler's*, **258**, 117.
 MONOD, J., COHN, M. (1952). *Advances in Enzymology*, vol. 13, Interscience publishers, inc., New York, 119.
 NISMAN, B., FUKUHARA, H. (1959 a). *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, **249**, 1725. — (1959 b). *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, **249**, 2240.
 NISMAN, B., FUKUHARA, H., DEMAILLY, J., GENIN, C. (1962). *Biochem. Biophys. Acta*, **55**, 704.
 NISMAN, B., COHEN, R., KAYSER, A., FUKUHARA, H., DEMAILLY, J., GENIN, C., GIRON, D. (1962). *Cold Spring Harbor Sympos.*, **26**, 145.
 NISMAN B., PELMONT, J., DEMAILLY, J., YAPO, A. (1963). *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, **256**, 523.
 NISMAN, B., DEMAILLY, J., YAPO, A., PELMONT, J. (1963). *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, **256**, 4117.
 NISMAN B., ZUBRZYCKI Z., BISHOP D. et PELMONT J., (1963). *Life Science*, **1**, 768.
 NOVELLI, G. D., KAMEYAMA, T., EISENSTADT, J. M., (1962). *Cold Spring Harbor Sympos.*, **26**, 133.
 PELMONT, J., YAPO, A., DEMAILLY, J., NISMAN, B. (1963). *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, **256**, 801.
 PERRIN, D. (1963). (Communication personnelle).
 REICH, E., GOLDBERG, I. H., RABINOWITZ (1962). *Nature (London)*, **196**, 743.
 TISSIÈRES, A., SCHLESSINGER, D., GROS, F. (1961). *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, **46**, 1450.
 ZABIN, I. (1963). (Communication personnelle).

